

“Detección de *Salmonella* spp. mediante PCR en Muestras de Embutidos, Cereales y Superficies Inertes”

Ian Fabricio Armendáriz Toral
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción (FIMCP)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
ianfat@hotmail.com

Pierina Elizabeth Barreiro Zambrano
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción (FIMCP)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
pierinabarreiro@hotmail.com

Efrén Santos
Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción (FIMCP)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
efren.santos@gmail.com

Gloria Bajaña
Laboratorio PROTAL
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
efren.santos@gmail.com

Resumen

En este documento se presenta la comparación del método tradicional (microbiológico) y el método alternativo de PCR, para la detección de Salmonella spp. en embutidos, cereales y superficies inertes, con el objetivo de demostrar la veracidad de la PCR tomando como patrón el método tradicional. Se evaluaron tres matrices de muestras: superficies inertes, cereales y embutidos con dos parejas de iniciadores en el PCR. Cada matriz constó de 10 muestras y cada muestra se analizó por triplicado (muestra inoculada con un control positivo, un control negativo y sin inocular) para posteriormente realizar los análisis estadísticos, económicos y protocolares pertinentes. Como resultado de los análisis realizados se obtuvo que en superficies 33 de las muestras dieron positivo y 67 negativo, en cereales 28 dieron positivo, 67 negativo y 5 falsos negativos; y por último en embutidos se obtuvo 67 negativos, 25 positivos y 8 falsos positivos. Estos resultados demostraron que hay concordancia entre los métodos tradicional y PCR, siendo ambas técnicas eficientes para la detección de Salmonella spp. en las muestras analizadas. Se validó estadísticamente la concordancia de resultados del procedimiento de detección de Salmonella spp. molecular y microbiológico, logrando identificar restricciones en el análisis y descartando amplificaciones de fragmentos genéticos no deseados.

Palabras Claves: Salmonella, PCR, método tradicional.

Abstract

This paper presents a comparison of the traditional method (microbiological) and PCR alternative method for the detection of Salmonella spp. in sausages, cereals and inert surfaces, in order to demonstrate the

accuracy of the PCR using the standard traditional method. Three types of samples were evaluated: inert surfaces, cereals and sausages with two pairs of primers in the PCR. Each array consisted of 10 samples and each sample was tested in triplicate (sample inoculated with a positive control, negative control and non-inoculated) to later perform analyzes. As a result of the analysis surfaces 33 of the samples gave positive and 67 negative in the surfaces tested; in cereals 28 tested positive, 67 negative and five false negatives; and finally 67 were negative, 25 positive and 8 false positive when the sausages were tested. These results demonstrated a match between traditional methods and PCR. Both were efficient techniques for the detection of *Salmonella* spp. in the samples analyzed. The results were statistically validated for the methodology of the molecular and microbiological techniques, and succeeded in identifying constraints in the analysis and amplifications, discarding unwanted genetic fragments.

Keywords: *Salmonella*, PCR, traditional method.

1. Introducción

Salmonelosis es una palabra común en el léxico de los ecuatorianos, esta patología es tan cotidiana en nuestro medio que se ha perdido, en cierto nivel, la conciencia de que la incidencia de esta enfermedad indica un grave problema sanitario.

A nivel industrial, la vigilancia y medidas de control de este patógeno en todas las etapas en la cadena de procesamiento de alimentos, constituye un factor crucial en la gestión de la inocuidad de los productos, tanto así que en una gran cantidad de países, incluyendo Ecuador, se maneja una tolerancia cero con respecto a la presencia de esta bacteria en productos de consumo directo.

Se conoce que los métodos tradicionales de detección de *Salmonella* se basan en el cultivo en medios selectivos y la posterior caracterización de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Estos métodos requieren una gran inversión de tiempo.

La industria alimentaria, actualmente, demanda métodos rápidos de detección de ciertos patógenos, entre ellos los diversos serotipos de *Salmonella*, sin embargo muchos de estos métodos no gozan de una confianza que sustituya por completo la metodología tradicional. A causa de esto, se ha acudido al desarrollo biotecnológico, como las técnicas moleculares, como una herramienta fiable y rápida en la detección de microorganismos en muestras de alimentos.

El objetivo de esta tesis fue enfocado en desarrollar un ensayo de PCR capaz de detectar *Salmonella* en muestras de alimentos seleccionadas y solventar estadísticamente la validez de este método frente a la metodología microbiológica tradicional, estableciendo sus

limitaciones tanto operacionales como económicas.

2. Información General

2.1. Objetivo General

Evaluar la veracidad del método de PCR, en relación a la metodología microbiológica tradicional, para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes.

2.2. Objetivos Específicos

- Validar estadísticamente el procedimiento de detección de *Salmonella* spp. en las muestras de embutidos, cereales y superficies inertes por la técnica de PCR.
- Bosquejar los lineamientos de protocolo básicos para detectar *Salmonella* en muestras alimentarias, con bases en la experimentación realizada.
- Comprobar la especificidad de amplificación del gen *invA* ante fragmentos de ADN no deseados de otros microorganismos patógenos comunes en muestras alimentarias.
- Identificar las variables que existen en el análisis, que puedan afectar los resultados en detección de *Salmonella* spp. en las muestras de embutidos, cereales y superficies inertes por la técnica de PCR.
- Estimar y comparar las variables de costo y tiempo requeridas por cada metodología.

3. Materiales y Metodología

3.1. Toma y preparación de muestras

Como ya se indicó previamente, se tenían tres matrices: cereales, embutidos y superficies inertes en el muestreo se tomaron 4 tipos de cereales de distintas marcas comerciales: “arroz crocante con sabor a vainilla”, “cereal con salvado de trigo”, “Arroz crocante con sabor a chocolate” y “hojuelas de maíz azucaradas”. Así mismo para los embutidos se tomaron “salchichas frankfurt” de dos distintas marcas comerciales, una marca de “salchicha vienesa de pollo” y una de “salchichas de línea diaria”. En cambio, para las superficies inertes, bajo previo permiso, se tomaron muestras en distintas superficies en la cocina de un servicio de alimentación de la ESPOL con hisopos de transporte estériles.

Se evaluó cada matriz de tres maneras: inoculadas con *S. typhimurium*, inoculadas con un control negativo, en este caso *E. coli*, y sin ninguna clase de inoculación. Por cada evaluación de las matrices se realizaron 10 repeticiones para aumentar la fiabilidad de los resultados.

Para la contaminación de las muestras, tanto con *S. typhimurium*, como con *E. coli* como controles positivos y negativos, respectivamente, se realizó un raspado de un cultivo puro (en PCA) de estas cepas para llevarlas a 10 ml de un caldo de enriquecimiento Lethen. Posteriormente se tomó 1 ml de este caldo contaminado para la inoculación de cada superficie o muestra, según haya sido el caso.

3.2. Procedimiento microbiológico para embutidos y cereales

El pre enriquecimiento se realizó en 90 ml de caldo lactosado, la relación cultivo-muestra es 90:10. El caldo se dispensó asepticamente en fundas estériles.

Se pesaron 10 g de cada muestra a analizar, se sellaron y se homogenizaron por medio minuto en un Stomacher. Las fundas fueron previamente etiquetadas para su identificación.

Se llevó el caldo con la muestra a incubación a 37 grados Celsius por 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas, se tomó alrededor de 1 ml de cada muestra y se lo transfirió asepticamente a tubos de ensayo estériles, previamente etiquetados. Estas muestras fueron dirigidas al diagnóstico molecular de las mismas.

Para continuar con el análisis microbiológico, se pasó al enriquecimiento selectivo tomando 1 ml de cada muestra y llevándolo a un tubo con 10

ml de caldo tetrionato estéril, al que previamente se le adicionó 0,2 ml de una solución de yodo-yoduro y 0,1 ml de una solución de verde brillante. Se llevó a incubación por 24 horas a 37 grados Celsius.

Las muestras enriquecidas fueron posteriormente inoculadas en tres medios de cultivos selectivos: agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), Hektoen entérico agar y agar bismuto sulfito y llevadas a incubación por 48 horas a 37 grados Celsius.

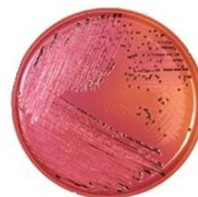


Figura 1. Salmonella positivo en Hektoen Entérico Agar.

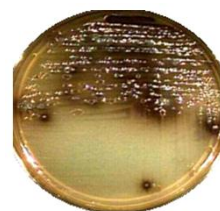


Figura 2. Salmonella positivo en Bismuto Sulfito Agar.



Figura 3. Salmonella positivo en XLD Agar.

3.2. Procedimiento para el diagnóstico molecular

Se amplificó una región del gen *invA* (Rahn *et al.* 1992). El gen *invA* está situado en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* spp. que codifica las proteínas de un sistema de secreción tipo III (Collazo, CM y Galán JE, 1997). Además, se comparó la efectividad de dos sets de iniciadores para la detección específica de *Salmonella* spp.

Para la indicación de una posible inhibición de la PCR por productos derivados de la muestra, se llevaron controles internos, los cuales consistieron en siempre analizar, por cada gel de agarosa, una muestra inoculada con *Salmonella typhimurium* (como control positivo) y una muestra de *E.coli* (como control negativo).

Es de máxima importancia evitar todo tipo de contaminación en el análisis molecular, tanto de la muestra como del laboratorio, por lo que se llevaron a cabo ciertos procedimientos preoperacionales como:

- Se encendió por 30 minutos la luz UV de la cabina de procedimiento para PCR, conteniendo tubos Eppendorf de 0.2 mL, puntas, guantes, micropipetas, marcador indeleble y demás materiales necesarios para el diagnóstico molecular.

- Transcurridos los 30 minutos, se limpió la superficie con una solución descontaminante de posibles trazas de ADN, (DNA AWAY®, Catálogo S2571505).

- Se realizó la descongelación de los reactivos, en donde una vez que se descongelaron se mantuvieron en hielo o *coolers* para evitar la degradación de los mismos.

- Con puntas estériles se preparó el MasterMix, en la cual se adicionaron por cada muestra, 0.25 µl de cada iniciador (forward y reverse), 5 µl de GoTaq® (Promega), y el resto se lo completó con agua para llegar a 9 µl. Todo esto se multiplicó por el número de muestras totales que tuvimos en cada corrida: 30 muestras más 1 control positivo (Cepa aislada de *Salmonella*) y más 1 control negativo (Cepa aislada de *E.coli*). Posteriormente se repartieron 9 µl en cada tubo Eppendorf esterilizado y rotulado.

- Se llevaron las muestras a analizar junto a los viales en sus coolers al área de siembra. Previamente se esterilizó la cabina de flujo laminar con luz UV por 30 minutos y luego se esterilizó con alcohol las superficies de contacto.

- Se procedió a pasar 1 µl del caldo lactosado con la muestra que contenía el ADN a los viales con MasterMix. Luego de esto se realizó un agitado manual.

- Los tubos Eppendorf preparados, se ingresaron en el termociclador y se programó el termociclador de acuerdo a cada pareja de iniciadores (Tablas 1 y 2) ya establecido para el iniciador a usar.

- Mientras se realizaba la amplificación, se preparó el gel de agarosa: pesando 1,5 g de agarosa y disolviéndolo en 100 ml de tris-acetato-EDTA (TAE) para lograr una

concentración del 1,5%. Posteriormente se lo calentó para que se disuelva en un microondas, teniendo en cuenta que no se formen burbujas.

- Se esperó a que la solución de agarosa se enfriara un poco y se le adicionó 10 µl de SYBR Safe (10.000x, Invitrogen), un reactivo fluorescente que se intercala entre las pares de bases que conforman el ácido nucleico, y se lo puso en el molde, el cual debe estar correctamente nivelado. Es sumamente importante mantener el gel lo menos expuesto a la luz.

- Una vez que el termociclador realizó la amplificación, se llevó el gel a la cubeta electroforética conteniendo el tampón TAE para llevar a cabo la electroforesis (luego de que se sembraron y se colocó el marcador de peso molecular) a 120 voltios por 20 minutos.

- Transcurrido este tiempo, se transporta el gel una cámara de Luz UV, en la cual podremos visualizar el ADN amplificado.

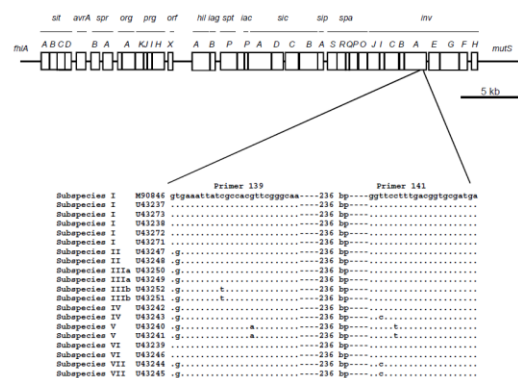


Figura 4. Mapa de la isla de patogenicidad 1 (SPI1). Las secuencias de alineamiento de los cebadores 139/141 (Rahn *et al.* 1992) con respecto a las subespecies de *Salmonella ssp* muestra en la parte inferior. Un punto indica una secuencia idéntica de nucleótidos con respecto al iniciador.

3.3. Aislamiento e identificación microbiológica

El aislamiento e identificación se evaluó en los medios de cultivo XLD Agar, Bismuto-Sulfito Agar y Hektoen Entérico Agar. Primariamente usamos este estudio para confirmar la pureza del cultivo y determinar si la morfología y característica de las colonias eran indudablemente correspondientes a *Salmonella ssp*.

Así obtuvimos que en los resultados positivos en Agar Hektoen Entérico, la identificación de microorganismos del género *Salmonella* está determinada por el crecimiento de colonias con

una coloración negra en su parte central y transparente alrededor, lo que ha permitido, en el dialecto común, definir que los microorganismos del género *Salmonella* en agar Hektoen crecen con apariencia de “ojo de pescado” (Figura 2) (Luna, 1991; Gaillot *et al.*, 1999; Dusch y Atwegg, 1993).

En el caso del Agar Bismuto Sulfito, las colonias de *Salmonella* crecidas sobre este, muestran un centro negro rodeado de un borde claro; están bordeadas también de un precipitado negro con brillo metálico, por la reducción de iones de bismuto que se transforman en bismuto metálico. A veces, las colonias son marrones, grises o verdes (Figura 3) (Pascual y Calderón, 2000).

Por último, las colonias de *Salmonella* desarrolladas sobre Agar XLD, son rojas con centros negros debido a un cambio de pH por fermentación de la xilosa y descarboxilación de la lisina. Los centros negros se deben a la producción de H₂S. A veces no se forman centros negros o, por el contrario, las colonias son negras casi por completo (Pascual y Calderón, 2000).

La caracterización bioquímica solo se continuó con las colonias que resultaron sospechosas de ser positivas en los medios previamente mencionados. Se utilizaron las pruebas de bioquímica más comunes como lo son urea, agar hierro triple azúcar (TSI) y lisina.

De acuerdo al protocolo establecido el diagnóstico molecular, cada corrida en la PCR fue llevada bajo los parámetros de Buenas Prácticas de Laboratorio y cerciorándonos de que las muestras y variables estén debidamente identificadas y controladas.

Adicionalmente a esto, más adelante se va a llevar a cabo una estimación de tiempos y costos, para la cual, se ha tomado en cuenta todos y cada uno de los materiales, equipos y reactivos usados para el ensayo de PCR, así como el tiempo que tomó realizarlo.

4. Análisis Estadístico

Las variables que pasan a ser las más críticas en un típico estudio de fiabilidad son: el sesgo entre observadores (la tendencia de un observador a dar consistentemente valores mayores que otro) y la concordancia entre observadores (hasta qué punto los observadores coinciden en su medición).

Con respecto al segundo aspecto, la manera concreta de abordar el problema depende directamente de la naturaleza de los datos: si

estos son de tipo continuo es habitual la utilización de estimadores del coeficiente de correlación intraclase, mientras que cuando se trata de datos de tipo categórico el estadístico más empleado es el índice kappa.

- Kappa de Cohen

El índice kappa relaciona el acuerdo que exhiben los métodos de observación, más allá del debido al azar, con el acuerdo potencial también más allá del azar. En esencia, el proceso de elaboración del índice es el siguiente: se calcula la diferencia entre la proporción de acuerdo observado y la proporción de acuerdo esperado por azar; si ésta es igual a cero, entonces el grado de acuerdo que se ha observado puede atribuirse enteramente al azar; si la diferencia es positiva, ello indica que el grado de acuerdo es mayor que el que cabría esperar si solo estuviera operando el azar y viceversa: en el caso (ciertamente improbable) en que la diferencia fuera negativa entonces los datos estarían exhibiendo menos acuerdo que el que se espera solo por concepto de azar. Kappa es el cociente entre esa cantidad y el acuerdo máximo que se puede esperar sin intervención del azar.

Landis y Koch propusieron en 1977 una escala de interpretación del valor de kappa que considera como aceptable un valor mayor o igual a 0,40 y excelentes los valores superiores a 0,75.

Tabla 1. Tabla cruzada de los resultados de dos variables dicotómicas con el mismo resultado (método 1 y método 2).

		Método 2		
		Sí	No	Total
Método 1	Sí	a	b	a+b
	No	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	n

La proporción de coincidencias frente al total de sujetos en este caso sería (a+d)/(a+b+c+d), es decir, (a+d)/n. Por simple azar, es previsible observar un cierto grado de concordancia entre los dos métodos, para determinar si la concordancia observada es superior a la que se esperaría encontrar por azar resulta conveniente utilizar el índice de concordancia de kappa, que se define como:

$$K = (P_o - P_e) / 1 - P_e$$

Donde P_o representa a la proporción de concordancia observada y P_e la proporción de concordancia esperada por azar. Por tanto, el índice kappa presenta un valor de 1 cuando la

concordancia observada es perfecta, un valor de 0 cuando la concordancia observada es igual a la concordancia esperada por azar y valores inferiores a 0 cuando la concordancia observada es inferior a la concordancia esperada por azar.

La proporción de concordancia esperada por azar (P_e) se calcula como la suma del producto de las probabilidades de clasificar los sucesos en cada una de las categorías por cada uno de los métodos. Analíticamente:

$$P_e = (a+b)(a+c) + (c+d)(b+d) / n^2$$

Para interpretar orientativamente qué significado tiene el valor del coeficiente que obtengamos al calcular sobre nuestros datos.

Tabla 2. Grado de acuerdo del índice de kappa

kappa	Grado de acuerdo
<0	sin acuerdo
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Bajo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bueno
0,8 - 1	muy bueno

El estudio de comparativo incluyó tres características de la prueba: Precisión Relativa (PR), Sensibilidad Relativa (SR), Especificidad Relativa (ER).

La precisión relativa se define como el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método alternativo y el método de referencia de muestras idénticas, se define por: $(AP + AN + VP + FN + FP) \times 100 / (AP + AN + VP + FN + FP)$, donde AP se refiere al acuerdo positivo, AN a un acuerdo negativo, FP a los falsos positivos, VP de verdaderos positivos y falsos negativos FN.

La sensibilidad relativa se define como la capacidad del método alternativo para detectar el microorganismo objetivo en comparación con el método de referencia, como sigue: $(AP + VP) \times 100 / (AP + FN)$.

La especificidad relativa se define como la capacidad del método alternativo para no detectar el microorganismo diana cuando no es detectado por el método de referencia, como sigue: $(AN \times 100) / (AN + FP)$.

Los resultados falsos negativos se definieron como las muestras que dan un resultado negativo con PCR y un resultado positivo con el método tradicional. Los resultados verdaderos positivos se definen como muestras con resultados positivos en PCR y resultados

negativos en el método tradicional cuando las muestras fueron contaminadas artificialmente.

5. Resultados

5. 1. Análisis Estadístico Comparativo Del Método PCR Y Tradicional

Se pretendió evaluar todas las variables posibles de ambos métodos de detección, así como también el desempeño de los cebadores y si la matriz demuestra presenta alguna restricción en su diagnóstico.

En la figura 5 se muestra un resultado típico de un análisis de PCR, en los carretes de los extremos se coloca un marcador de peso molecular, en este caso de 500 pb. Con esta guía podemos estimar si las muestras analizadas fueron amplificadas acorde a los iniciadores empleados. Los espacios que denotan un blanco intenso se consideran como resultados positivos, ya que su fluorescencia ante la luz UV es el indicador de que el gen en cuestión se ha amplificado en una cantidad suficiente en la PCR.

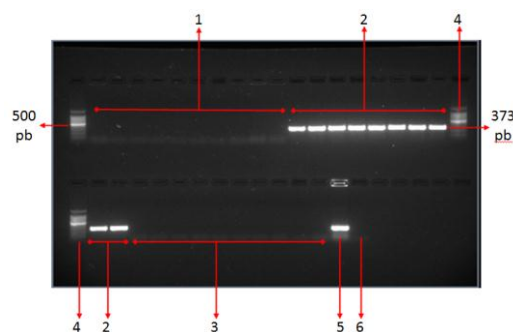


Figura 5. Muestras tomadas de superficies inertes en el gel al 1.5% de agarosa con el par de iniciadores Malo2 F y Malo2 R. 1: Muestras sin inocular. 2: Muestras inoculadas con *S. typhimorium* con tamaño de amplificación de 373 pb. 3: Muestras inoculadas con *E. Coli*. 4: Marcador molecular que va de 100 pb a 500 pb es la banda más intensa. 5: Control positivo. 6: Control negativo.

Se estudió el desempeño de cada pareja de cebadores con cada matriz de muestra, los resultados de los análisis de embutidos se detallan en el Anexo 1.

Se observa que en la evaluación de la matriz "Embutidos" se evidenció una concordancia moderada con la utilización del cebador Malo2F-Ra mientras que hubo una concordancia perfecta con los cebadores 139/141. Esta desviación se debió posiblemente debido a que por error se realizó el diagnóstico molecular a partir del medio de cultivo selectivo

y mas no del pre enriquecimiento como dicta la metodología.

De la misma manera se evaluó cada matriz de cereales con cada par de iniciadores (Anexo 2).

La matriz “Cereales” presentó mayor un índice de concordancia perfecto con los iniciadores 139/141 y un índice bueno para Malorny2F-Ra. Esta variación se observó en las muestras que poseían chocolate, lo que nos llevó a realizar una investigación y corroborar que en ciertas ocasiones ciertos compuestos presentes en el chocolate pueden inhibir la PCR, esto se lo detallará más adelante.

La tercera matriz, las superficies inertes también se evaluaron de forma cruzada con cada par de cebadores (Anexo 3). Esta presentó con ambos iniciadores un índice de concordancia perfecto.

Finalmente, se evaluaron todos los resultados obtenidos con cada pareja de cebadores y su correspondiente resultado según la metodología tradicional (Anexo 4).

La evaluación del desempeño de los iniciadores nos indica que todas las muestras diagnosticadas con el par de iniciadores 139/141 mostraron una concordancia perfecta con respecto al método tradicional. Las muestras evaluadas con la pareja de primer Malo2F-Ra denotaron un índice bueno, pero obviamente menor al par antes mencionado debido a que el 9% de los resultados fueron falsos negativos.

Finalmente, la Precisión Relativa, Sensibilidad Relativa y Especificidad Relativa fueron evaluadas para la PCR en comparación al método clásico microbiológico como se muestra en el Anexo 5 en un resumen completo de todos los parámetros estadísticos, los cuales demuestran una alta fiabilidad de todos los casos que fueron objeto de estudio.

5. 2. Estimación de Tiempos y Costos

A continuación, se muestra un cálculo estimado de los tiempos empleados en cada uno de los pasos para llevar a cabo los métodos que aquí comparamos, PCR y método tradicional; a su vez, se hizo una lista resumida de gastos (Tabla 3), basados en todos los reactivos, materiales y equipos que se usó para desarrollar la técnica de PCR; cabe recalcar que no se va a realizar en detalle el bosquejo de los gastos para realizar el método tradicional, porque se va a basar en el precio final que ha establecido los laboratorios ubicados en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), PROTAL.

Es necesario recalcar que para poder implementar un centro que realice este tipo de análisis se necesita de una alta inversión, para la adquisición de equipos y para una adecuación de las diversas áreas del laboratorio. Esto debido a que las herramientas necesarias para el desarrollo de la técnica, como el termociclador y el transiluminador UV con cámara, que son los equipos más representativos en la inversión inicial, presentan un costo considerablemente elevado, al igual que un posible reacondicionamiento de la infraestructura, necesaria para tener un área apta y exclusiva para análisis de PCR, puesto que debe ser un área exenta de posibles contaminantes de ADN, e incluso de la luz en ciertas etapas.

A continuación se indica una breve recopilación de costos a considerar para el diagnóstico molecular:

Tabla 3. Costos del análisis de PCR

COSTO DEL ANÁLISIS DE PCR	
MANODE OBRA	7
EQUIPOS	5
REACTIVOS	4
TOTAL	16

Si bien es cierto, al hacer los cálculos de tiempos empleados en los ensayos tanto para PCR como para el método tradicional, no es el tiempo estipulado en las tablas 4 y 5 como TOTAL, y esto se debe a que en el caso de estos procedimientos por ejemplo en el de PCR, si se pone a enriquecer la muestra el día 1 a las 9 am, estará lista para las 9 am del día 2, y de aquí sumado las 7 horas faltantes para terminar el ensayo se cumplen las horas del día laboral, por lo tanto en total serán 2 días.

Tabla 4. Duración del procedimiento de PCR en días laborables

DURACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PCR	
Pre enriquecimiento	24h
Preparación de muestras para PCR	2h
Análisis de PCR	4h
Electroforesis y observación	1h
TOTAL	2 días

Tabla 5. Duración del método tradicional en días laborables

PROCEDIMIENTO	DURACIÓN
Preparación de muestra y agares	2h
Pre enriquecimiento	24h
Tetratonato	24h - 48h
XLD Agar	24h - 48h
Bismuto Agar	
Hektoen Agar	
TOTAL	4 días

En el caso del análisis de *Salmonella* por el método tradicional, tomamos como referencia el costo por muestra que tiene establecido los Laboratorios de PROTAL, como se dijo anteriormente, que es 12 dólares por muestra. Por otro lado, al hacer las experimentaciones, se notó que hacer el análisis de PCR, el tiempo usado en el ensayo se reducía a la mitad, comparado con el método tradicional.

Como podemos observar en la Tabla 26, el método tradicional demora 4 días en su realización mientras que para el método de PCR se necesitan 2 días, por lo que, para la industria es mucho más factible usar este método. Sin embargo, compensando el tiempo que se ahorra al hacer el ensayo de PCR, éste es más costoso debido a los reactivos y los equipos sumamente costosos que se emplean para su ejecución, con un precio de 16 dólares por muestra en contraste con el método tradicional que cuesta 12 dólares por muestra.

Cabe recalcar que esto es sólo una estimación de los costos ya que debido a las múltiples variables y a que la tesis no se centra en esto, no se hizo un estudio detallado de los costos.

5. 3. Discusión

El presente trabajo es un estudio que busca ser precursor de la detección del gen *invA* en *Salmonella* spp. aislada de muestras de alimentos en el Ecuador, pretendiendo una pronta aplicación de métodos moleculares para detección de patógenos en nuestro medio y el desarrollo de estudios similares.

El consumo de alimentos de carácter masivo y la industria dedicada a la elaboración de los mismos tiene una particular relevancia dentro de la producción y desempeño económico nacional. Según las Cuentas Nacionales, en el 2007 el valor agregado de la industria manufacturera (sin incluir la refinación de petróleo) representó el 13,99% del Producto Interno Bruto (PIB) siendo la industria de alimentos y bebidas la de mayor aporte (7,83% del PIB) (Carrillo, 2009). Este mismo sector productivo muestra un incremento de exportaciones en los 10 últimos años, principalmente hacia Europa y Norteamérica, siendo un notorio inconveniente que, a medida que se ha observado un aumento de volumen en las exportaciones, los productos rechazados por inconformidades en la calidad también se han visto incrementados.

Analizando los reportes y resultados de enfermos de intoxicaciones alimentarias, EDA, fiebre tifoidea y salmonelosis se deduce que siguen siendo un riesgo común en nuestro medio, lo que hace necesario la implementación de programas de control sanitario más efectivos acompañados de programas de vigilancia epidemiológica y una apertura de los servicios de Salud Pública en la determinación de los diagnósticos etiológicos, cuyos datos que se destinen a un sistema de registro estadístico que se pueda emplear como base para una mejora del Sistema de Vigilancia Epidemiológica, a cargo del Ministerio de Salud Pública.

El empleo de técnicas alternativas en la gestión de inocuidad en los alimentos va ganando cada día más adeptos en el área industrial, especialmente aquellas cuyo principal valor agregado es la reducción de tiempo para obtener resultados. Pese a esto son pocos, o incluso nulos, quienes emplean métodos de diagnóstico molecular, como lo es la Reacción en Cadena de Polimerasa en la industria de alimentos en el Ecuador. Esto puede deberse a muchos factores, listando entre ellos la falta de conocimiento del método y la ausencia de estudios realizados localmente que avalen la utilización de la técnica de PCR en nuestro medio y así obtener una herramienta de diagnóstico caracterizada por su rapidez, versatilidad de automatización, reproducibilidad y confianza.

En el presente estudio se realizó la amplificación del gen *invA*, uno de los genes descritos en todas las cepas invasivas de *Salmonella* (Galán, 1991) con dos pares de

cebadores, replicando satisfactoriamente los resultados que brinda la PCR, tales como especificidad y capacidad para procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo en comparación a métodos tradicionales, como ya han sido descrito en una gran cantidad de estudios similares previos (Chen *et al.*, 1997; Malorny, 2004; Di Pinto *et al.*, 2007).

Estadísticamente, se encontró un muy buen acuerdo entre los dos métodos mediante el empleo del índice de kappa, demostrando que tanto el método microbiológico como el molecular pueden ser usados en el análisis de *Salmonella* spp. en este tipo de muestras, dejando abierta la posibilidad de la adopción de la metodología no convencional si lo amerita, luego de haber evaluado una serie de aspectos como el costo operacional, inversión inicial (de ser necesaria), la urgencia en la obtención de resultados para liberación de lotes que desencadena en un menor costo de almacenamiento y un mayor tiempo de vida en percha del vendedor final, si fuese el caso.

Luego de pruebas realizadas y su respectivo análisis, se ha observado la técnica de PCR es una prueba muy sensible, esta sensibilidad varía dependiendo del tipo de alimento analizado, del métodos de preenriquecimiento aplicados y del método, de un trabajo adecuado del analista y también del método y la fuente de extracción del ADN.

Lo importante es que este estudio es válido para las matrices evaluadas, si se quisiese aplicar lo descrito en este estudio en otro tipo de muestra es necesario un estudio previo de las limitantes posibles y llevar a cabo una prueba piloto del examen, adecuando la técnica a cada tipo de alimento. Así mismo, si fuese necesaria la detección de otras bacterias invasivas tales como *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *E. coli* enteroinvasiva y demás, se deberá elegir los cebadores adecuados ya que la ausencia de la secuencia del gen *invA* en otro género de patógenos dejaría el procedimiento descrito sin validez.

Existen algunas limitaciones para la reproducibilidad de este estudio que deben considerarse si se quisiese aplicar el método en otros laboratorios. Se ha descrito que los resultados pueden variar de acuerdo al termociclador que se emplee, ya sea por marca o incluso entre modelos de la misma marca (Reynisson, 2006), por lo que es necesario ajustar el programa de temperaturas y

componentes de la PCR antes de establecer una metodología.

Un problema que se repite en muestras de alimentos es la presencia de inhibidores, en este trabajo se experimentó problemas con el análisis de muestras que contenían derivados de cacao, este inconveniente ya ha sido declarado (Di Pinto *et al.*, 2007).

Esto puede solucionarse mediante varios métodos, en el presente trabajo se ha elegido una centrifugación del caldo de preenriquecimiento que contenía la muestra y tomando el sobrenadante para realizar el análisis, obteniendo resultados positivos. Así mismo, el crecimiento del microorganismo objetivo podría verse inhibido por la flora acompañante, dando un resultado negativo por el método tradicional, o bien, la sensibilidad del ensayo de PCR podría ser disminuida.

Por esto, es importante seleccionar un medio de enriquecimiento adecuado para inhibir la flora de fondo y establecer un tiempo de incubación adecuado, ya que la sensibilidad de la PCR tiende a aumentar con el incremento del tiempo de enriquecimiento (Guo *et al.*, 2000).

6. Conclusiones

Se estandarizó la técnica molecular de PCR para la detección del gen *invA*, característico de la *Salmonella* spp. en muestras de cereales, embutidos y superficies inertes, las cuales son matrices comunes en la industria alimentaria del Ecuador.

Se demostró que el método tradicional y la técnica de PCR no difieren significativamente entre ellos mediante el estudio estadístico de la experimentación, donde se evaluó la concordancia entre los resultados obtenidos por el método tradicional (microbiológico) y el método alternativo (PCR), llegando a establecer un índice kappa de 0.89, el cual equivale a una concordancia muy buena. Así mismo, el análisis estadístico determinó la precisión, sensibilidad y especificidad entre los métodos comparados, obteniendo valores de 96, 86.67 y 100, respectivamente.

El empleo de los iniciadores empleados (Malo2F/Malo2R y 139/141) no influye significativamente a la respuesta del análisis de detección de *Salmonella* spp. en las muestras. Además se verificó que estos iniciadores amplifican específicamente el gen de invasividad *invA*, presente en la gran mayoría de serotipos de *Salmonella* y ausente en el resto de bacterias.

Se identificó una restricción en el diagnóstico molecular de las muestras que contenían chocolate, lo que hizo necesario realizar una extracción del material genético de la muestra para su análisis mediante la técnica de PCR.

El tiempo de detección molecular es mayor que el microbiológico. El método tradicional demandó alrededor de 96 horas, que es el doble del tiempo que tomó el análisis por la técnica de la PCR (48 horas) para la obtención de resultados, siendo el factor tiempo el mayor beneficio del protocolo propuesto.

Económicamente, el costo operativo de la PCR es mayor al ensayo microbiológico. Se estima que es menor el valor monetario de un análisis microbiológico que el de un diagnóstico molecular, ya sea por costo de análisis por muestra o por costo de la inversión inicial.

Es necesario realizar un estudio previo a la matriz, en caso de no tener un historial de la misma. En caso de sospechar la presencia de un inhibidor, se recomienda realizar un tratamiento de extracción de ADN que preceda a la PCR, evitando así un posible error en los resultados.

Se recomienda hacer un estudio de sensibilidad de detección de la técnica de PCR para establecer el límite mínimo en que se pueda identificar la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos.

Sería recomendable efectuar más estudios que promuevan el desarrollo de técnicas alternativas y modernas aplicables en la industria de producción de alimentos, puesto que el desarrollo biotecnológico cada día propone nuevos métodos, con diversos beneficios, que deben ser tomados en cuenta para todos los que forman parte del sector industrial.

9. Referencias

1. **Rahn et al.** Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol. Cell. Probes. 1992. 6, 271-279.

2. **Collazo, C. M. & Galán, J. E.** The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review. Gene. 1997.192, 51–59.

3. **Luna, G.** Manual Operativo de Análisis Microbiológicos Para Alimentos. Primera

Edición. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá – Colombia. 1991.

4. **Gaillot, O.; Di Camillo, P.; Berche, P.; Courcol, R. y Savage, C.** Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Hektoen Enteric Agar for Isolation of Salmonella from Stool Samples. Journal of Clinical Microbiology. 1999. 37: 762 – 765.

5. **Dusch, H. y Altwegg, M.** Comparison of Rambach agar, SM-ID medium and Hektoen enteric agar for primary isolation of non-typhi salmonellae from stool samples. Journal of Clinical Microbiology. 1993. 31:410-412.

6. **Pascual, M. y Calderón, V.** Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Segunda Edición. Ediciones Díaz de Santos. Madrid – España. 2000.

7. **Landis, J y Koch, G.** The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33: 159-174.

8. **Galán, J. y Curtiss, R.** Distribution of the *invA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. Infect Immun. 1991. 59:2901–8.

9. **Chen, S; Yee, M; Griffith, C; Larkin, C; y Yamashiro, R.** The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. Int J Food Microbiol. 1997;35:239-50.

10. **Reynisson E, Josefsen M, Krause M, Hoorfar J.** Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. J Microbiol Methods 2006, 66:206-216.

11. **Guo, X.; Chen, J.; Beuchat, L. y Brackett, R.** PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hlyA*. Appl Environ Microbiol. 2000. 66:5248–52.

12. **Malorny et al.** Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. Appl Environ Microbiol. 2004. 70, 7046-7052.

13. Di Pinto, A.; Forte, V.; Guastadisegni, M. G.; MARTino, C.; Schena, F. y Tantillo, B. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. 2007. *Food Control*,18, 76-81.

<http://www.uasb.edu.ec/UserFiles/381/File/ALLI MENTOS.pdf>

14. Carrillo, D. La industria de los alimentos y bebidas en el Ecuador. [En línea] 2009.

Anexo 1

Tabla A-1. Tradicional Embutido – Embutido Malorny.

		TRADICIONAL EMBUTIDO		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
EMBUTIDO MALORNY	NEGATIVO	20	5	25
		66,67 %	16,67 %	83,33 %
	POSITIVO	0	5	5
		0,00 %	16,67 %	16,67 %
	TODOS	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA		0,57142		

Tabla A-2. Tradicional Embutido - Embutido 139

		TRADICIONAL EMBUTIDO		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
EMBUTIDO 139	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODOS	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA		1		

Anexo 2

Tabla A-3. Tradicional Cereal – Cereal Malorny.

		TRADICIONAL CEREAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
CEREAL MALORNY	NEGATIVO	20	3	23
		66,67 %	10,00 %	76,67 %
	POSITIVO	0	7	7
		0,00 %	23,33 %	23,33 %
	TODOS	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA		0,756757		

Tabla A-4 Tradicional Cereal – Cereal 139

		TRADICIONAL CEREAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
CEREAL 139	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODOS	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA		1		

Anexo 3

Tabla A-5 Tradicional Superficie – Superficie Malorny.

		TRADICIONAL SUPERFICIE		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
SUPERFICIE MALORNY	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODOS	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA		1		

Tabla A-6. Tradicional Superficie – Superficie 139

		TRADICIONAL SUPERFICIE		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
SUPERFICIE 139	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODOS	20	10	30
	66,67 %	33,33 %	100,00 %	
KAPPA		1		

Anexo 4

Tabla A-7. Método Tradicional 139.

		TODO TRADICIONAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
TODO 139	NEGATIVO	60	0	60
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	30	30
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODOS	60	30	90
	66,67 %	33,33 %	100,00 %	
KAPPA		1		

Tabla A-8. Método Tradicional – Malorny.

		TODO TRADICIONAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
TODO MALORNY	NEGATIVO	60	8	68
		66,67 %	8,89 %	75,56 %
	POSITIVO	0	22	22
		0,00 %	24,44 %	24,44 %
	TODOS	60	30	90
	66,67 %	33,33 %	100,00 %	
KAPPA		0,785714		

Anexo 5

Tabla A-9. AP: Acuerdo Positivos, AN: Acuerdos Negativos, FN: Falsos Negativos, VP: Verdaderos Positivos, FP: Falsos Positivos, PR: Precisión Relativa, SR: Sensibilidad Relativa, ER: Especificidad Relativa, N = PA + FN + FP + VP.

Iniciadores PCR	Nº de Muestras						% Evaluado			k ^e
	N	AP	AN	FN	VP	FP	PR	SR	ER	
139-141	90	27	60	3	0	0	97	90,00	100	0,92
Malo 2F- 2Ra	90	25	60	5	0	0	94	83,33	100	0,86
TOTAL	180	52	120	8	0	0	96	86,67	100	0,89